

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, C12Q 1/68, 1/04, C07H 21/04	A1	(11) 国際公開番号 WO97/35970 (43) 国際公開日 1997年10月2日 (02.10.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00991 (22) 国際出願日 1997年3月25日 (25.03.97) (30) 優先権データ 特願平8/95971 1996年3月26日 (26.03.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本水産株式会社(NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.)(JP/JP) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目6番2号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) カストゥーリ ヴェンカテスワラン (KASTHURI, Venkateswaran)(IN/JP) 堂本信彦(DOUMOTO, Nobuhiko)(JP/JP) 〒192 東京都八王子市北野町559-6 日本水産株式会社 中央研究所内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 須藤阿佐子(SUDOU, Asako) 〒184 東京都小金井市梶野町5-6-3-103 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: OLIGONUCLEOTIDES USED FOR DETECTING VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS AND METHOD OF DETECTION THEREWITH (54) 発明の名称 腸炎ビブリオ検出のためのオリゴヌクレオチドおよびそれを用いた検出法 (57) Abstract An oligonucleotide having a nucleic acid sequence derived from SEQ ID NO:1 and at least one site capable of amplifying a nucleic acid sequence characteristic of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ; the above oligonucleotide having a nucleic acid sequence unavailable from SEQ ID NO:3; the above oligonucleotide incapable of amplifying nucleic acid sequences originating in <i>Vibrio alginolyticus</i> and <i>Vibrio harvei</i> ; the above oligonucleotide represented by the sequence of CGG CGT GGG TGT TTC GGT AGT or TCC GCT TCG CGC TCA TCA ATA; and a method of detecting <i>Vibrio parahaemolyticus</i> by preparing a primer set comprising two of the above oligonucleotides, selectively amplifying therewith a DNA gyrase subunit B gene sequence contained in a specimen as a target, and determining whether or not there is a gyrB unit specific for <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in the specimen. This method has made it possible to provide a primer which specifically reacts with a gyrB gene of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> to thereby differentiate and identify the same among other vibrios and strains other than the genus <i>Vibrio</i> . The primer specific for <i>Vibrio parahaemolyticus</i> serves to detect 285-bp gyrB gene fragments specific for this vibrio by the PCR method without the necessity for DNA extraction or like operations from bacterial cells.		

(57) 要約

配列番号1から得られる核酸配列をもち、腸炎ビブリオに特徴的な核酸配列を増幅し得る少なくとも1の部位を含むことを特徴とするオリゴヌクレオチド。配列番号3から得られない核酸配列である上記のオリゴヌクレオチド。ビブリオ アルジノリティカスおよびビブリオ ハーベイに由来する核酸配列を増幅し得ない上記のオリゴヌクレオチド。配列 C G G C G T G G G T G T T T C G G T A G Tまたは配列 T C C G C T T C G C G C T C A T C A A T Aで示される上記のオリゴヌクレオチド。上記のいずれかのオリゴヌクレオチドを2種類組み合わせたプライマーセットを用いて、検体中のDNAジャイレースサブユニットB遺伝子配列を標的とし、当該標的核酸配列を選択的に増幅させ、検体中に腸炎ビブリオに特異的なg y r Bユニットが存在するか否かを決定することで腸炎ビブリオの検出を行う方法。

腸炎ビブリオのg y r B遺伝子に特異的に反応して、他のビブリオ種及びビブリオ属以外の菌株から区別、同定できるようなプライマーを提供することができた。腸炎ビブリオ特異的プライマーにより、DNAの抽出等の操作なしで、菌細胞からの腸炎ビブリオ特異的な285bpのg y r B遺伝子断片をPCR法により検出できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出版をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BB	バ베이ラ	GG	ギリシャ	LX	ラトヴィア	SK	スロバキア
BE	ベルギー	GH	ガーナ	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MK	マケドニア	TM	トルクメニスタン
CC	中東	IT	イタリア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	KE	ケニア	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CH	スイス	KR	韓国	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボワール	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	US	米国
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	LI	リビア	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
DE	ドイツ	LT	リトアニア	NP	ネパール	YU	ユーゴスラビア
DK	デンマーク	LU	ルクセンブルグ	PT	ポルトガル		

明 細 書

腸炎ビブリオ検出のためのオリゴヌクレオチドおよびそれを用いた検出
法

5

技術分野

本発明は、腸炎ビブリオ (Vibrio parahaemolyticus, 以下、「V P」と略称することもある。) に特徴的な核酸標的配列の増幅のためのオリ
ゴヌクレオチドプライマーに関する。本発明は、DNA ジャイレースサ
10 ブユニット B 遺伝子 (Nucleotide sequence of DNA gyrase B subunit,
以下、「g y r B」という。) 特異的プライマーを用いたポリメラーゼ・
チェーン・リアクション (P C R) による腸炎ビブリオの検出方法に関
する。

15

背景技術

腸炎ビブリオは多くの国で食中毒菌として知られている。腸管以外の
部位や術後傷にも認められる。腸炎ビブリオはグラム陰性多形性桿状菌
であり、好塩性通性嫌気性菌で炭水化物を発酵してガスを発生する。チ
20 オ硫酸－クエン酸塩－胆汁酸塩－蔗糖 (T C B S) 寒天培地上に緑色の
コロニーを形成する。

腸炎ビブリオを検出するには通常、増菌培地を用いて培養し、選択的
平板培養法により単離する方法が用いられる。従来の検出法は1週間を
25 要するので、もっと迅速な方法が望まれている。

トリブシン活性を測定する蛍光アッセイ法は腸炎ビブリオを迅速に検

出するが、腸炎ビブリオをビブリオ アルジノリティカス、ビブリオ
ハーベイと区別できない。腸炎ビブリオとビブリオ アルジノリティカ
スの16S rRNA配列は99.7%の相同性を示すので腸炎ビブリ
オとビブリオ アルジノリティカスを同定するには時間のかかる方法し
5 か無かった。

- ビブリオ属は37の種からなる。いずれも水性環境に由来するもので
ある。rRNAの系統学的データによると*V. anguillarum*, *V. ordalli*,
*V. damsela*として知られている種は新しく設立された*Listonella*属、
10 *Photobacterium*属に移されている。10種が胃腸炎、傷の感染、ヒトの
敗血症に関連しており、7種が魚の病原菌として知られている。腸炎ビ
ブリオは通常河口や海といった環境に生息しており、しばしば夏期に海
水や魚介類から単離される。
- 15 腸炎ビブリオを単離、同定するには、検体をbromothymolblue-teepol
寒天培地またはTCBS寒天培地等の選択培地に接種し、青みがかった
緑色のコロニーを単離し、そのコロニーの生化学的性質を調べる。残念
ながら、多くのビブリオの種が同様の反応を示すので、確かな同定をす
るにはさらに詳細な生化学的試験が必要になる。多数の単離菌株につい
20 て広範囲な生化学的性質を調べるには多くの労力と時間と費用を要する。
腸炎ビブリオの血清学的同定法は他のビブリオと交差反応を示す。

先にDNAを利用するビブリオの種の同定法が開発されている。
V. cholerae 01からのコレラ毒素オベロンを増幅させて特異的にこの菌
25 を同定できるDNAプローブが用いられた。これらのプローブはコレラ
毒素を生産するコレラ菌以外のビブリオとも交差反応する。蛍光ラベル

したオリゴヌクレオチドプローブを用いてメンブランフィルター上でハイブリダイゼーションを行い、V. vulnificusを同定する方法も研究されている（Wright, A. C. et al., Appl. Environ. Microbiol. 59: 541-546, 1993）。

5

さらにV. vulnificusのサイトリジン遺伝子（hlyA）配列の部分からの共有結合でラベルしたオリゴヌクレオチドDNAプローブが作製された。これらのプローブは非毒素性V. vulnificusとは反応せず、したがって全てのV. vulnificusを検出しない。

- 10 同様に、毒性因子（TDH、TRH）の遺伝子をターゲットにした他の分子学的方法も毒素を産生する腸炎ビブリオを検出することはできる。しかし、この毒性因子を用いた場合、すべての腸炎ビブリオを検出することはできない。

15

発明の開示

本発明は腸炎ビブリオを他の36種のビブリオ属の菌と区別できる検出法の提供を目的とする。

- 20 腸炎ビブリオ特異的プライマーによりDNAの抽出等の操作なしで、菌細胞からの腸炎ビブリオ特異的な285bpのgyrB遺伝子断片をPCR法により検出する方法の提供を目的とする。

- PCRに有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供するため、本発明は、腸炎ビブリオに特徴的な核酸標的配列の増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーに関する。これらのプライマーとして、配列番号5、
25 6が例示され、それらはプライマーセットとして、腸炎ビブリオに特徴

的な核酸標的配列の検出に使用される。

- プライマーセットは、腸炎ビブリオに特徴的な核酸標的配列の在否の決定に関する方法に使用する。腸炎ビブリオ特異的プライマーにより、
- 5 腸炎ビブリオ特異的な g y r B 遺伝子断片が P C R 法により検出できる。

本発明において、「プライマー」は、標的核酸配列のあるセクションへのハイブリダイズを許す特異的ヌクレオチド配列を含む、合成によるかまたは生物学的に生産されたオリゴヌクレオチドである。

- 10 プライマーは、ポリメラーゼまたは同様な酵素により伸長合成されて完全な標的核酸配列を複製することができる。

- プライマーは核酸配列増幅法、例えば P C R 法および鎖置換増幅 (S D A) において利用される。特定のプライマーに、特に S D A 技術において有用なものは、標的核酸にハイブリダイズ可能な配列に加えて、制限
- 15 エンドヌクレアーゼの認識配列、およびポリメラーゼまたはポリメラーゼ様活性を継続する他の酵素がそれ自身その鋳型特異的オリゴヌクレオチド合成の開始を指示するための任意の配列を含む。

- 本発明において、「ハイブリダイゼーション」は、予め決定された反
- 20 応条件下にて部分的または完全に相補的な核酸鎖が逆平行 (アンチパラレル) 様式にて向かい合うようにして、特異的かつ安定な水素結合により二本鎖の核酸を形成する工程である。

- 上記のとおり、本発明は、腸炎ビブリオに特異的な核酸標的配列の在
- 25 否を決定するために有用なオリゴヌクレオチドプライマーに関する。

そのような決定を行うための方法は、P C R を用いた遺伝子増幅法に

とどまらず、従来技術であるサザンハイブリダイゼーション法等のプロ
ープとしての使用も含む。

本発明のプライマーは腸炎ビブリオの g y r B サブユニット遺伝子配
5 列に特異的である。プローブはプライマー増幅産物内の内部コンセンサ
ス配列に特異的である。

本発明者らは従来技術の上記問題を解決するために高特異性プローブ
としてDNAジャイレース（トポイソメラーゼⅡ）のBサブユニット蛋
10 白をコードする g y r B 遺伝子を用いる方法を検討した。

g y r B 遺伝子を直接シーケンスしたユニバーサルプライマーで
Pseudomonas putidaを検出、分類する方法が最近報告されている。これ
らのユニバーサルプライマーを用いて種々のグラム陰性菌、陽性菌の g
15 y r B 遺伝子部分がPCR法により増幅された。本発明者らはこれら既
存のプライマーを用いて37種のビブリオ属の g y r B の部分1.2 k
bを増幅した。腸炎ビブリオ ATCC 17802株（*Vibrio*
parahaemolyticus ATCC17802）、ビブリオ アルジノリティカス AT
CC 17749株（*Vibrio alginolyticus* ATCC 17749、以下、「VA」
20 と略称することもある。）の g y r B 塩基配列を示した。

本発明者らはさらに腸炎ビブリオの g y r B 遺伝子のみを増幅し、同
定できるPCRプライマーを作製した。これら腸炎ビブリオ特異的プラ
イマーの感度を調べるために118種の腸炎ビブリオの菌株、20種の
25 ビブリオ アルジノリティカスの菌株および、その他の菌株78種につ
いて検討した。

山本, 原山 (Appl. Environ. Microbiol. 61; 1104-1109, 1995) らは DNA gyrase B サブユニット蛋白のアミノ酸配列の保存された部位 2 カ所から gyr B 遺伝子を増幅させる PCR プライマーを作製した。これらのプライマーを用いて、種々の細菌からおよそ 1.2 kb の gyr B 遺伝子部分が増幅された。

腸炎ビブリオ ATCC 17802 株とビブリオ アルジノリティカス ATCC 17749 株から増幅された gyr B 遺伝子部分を遺伝子組み換えの常法 (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 1989) に従って適当なベクターによりクローン化した。

好ましいベクターとして pGEMzf (+) があげられるが、一般的なベクターであれば適宜選択して用いることができる。

pGEMzf (+) によりクローン化された腸炎ビブリオの 1.2 kb の gyr B 遺伝子部分はプラスミド pVPgyr B、ビブリオ アルジノリティカスからのものは pVAgyr B と呼ぶ。

プローブの増殖も常法 (Sambrook et al., 1989) によりなされる。例えば、プラスミドをベクターに挿入し、塩化カルシウムなどの有効な方法により大腸菌を形質転換する。形質転換した細胞は適正条件下で培養する。

目的とする遺伝子は菌体を溶解して回収し、アルカリ法等により精製する。精製したプラスミドをサンプルとして用いる。

腸炎ビブリオをビブリオ アルジノリティカスを含む他のビブリオから検出、区別するために PCR 法を試みた。この方法はプローブに相同性のある配列を増幅するので、事実上、感度を増すことになる。

プローブの塩基配列にしたがって、合成されたオリゴヌクレオチドプ

ライマーは、サンプル中に目的とする塩基配列が存在する場合のみ DNA を増幅する。感度を増加するだけでなく、DNA プロブの塩基配列に基づく特異的なオリゴヌクレオチドを使用することにより絶対的な特異性が得られる。

5

有効なプライマーを作製するために、pVPgyrB と pVAgyrB の塩基配列を DNA シークエンサーを用いて常法に従って決定した。

gyrB の塩基配列を決定するために、増幅断片の N 末端と C 末端部分も UP-1S、UP-2Sr プライマー（山本、原山, Appl.

10 Environ. Microbiol. 61: 1104-1109, 1995) を用いて決定した。さらに決定配列を伸展するために UP-1S を用いて得られた塩基配列から他のプライマーを作製した。増幅断片の全塩基配列は 1258 bp であり、配列番号 1 (pVPgyrB)、配列番号 3 (pVAgyrB) に示した。配列番号 1 がコードするアミノ酸配列を配列 2 に、配列番号 3
15 がコードするアミノ酸配列を配列 4 に示した。

この塩基配列の情報を用いて、腸炎ビブリオを他の細菌から検出、同定する 21 bp のプライマーを作製した。これらのプライマーは、配列番号 5 および配列番号 6 を含み、そしてプライマーセットとして利用可能である。
20

この新規のプライマーは既存の PCR を用いたアッセイ法 (Saiki et al., Science 239: 487-491, 1988) において有用である。このプライマーはサンプル中の目的とする DNA を増幅するのに用いられ、DNA 量を十分検出できるようにする。増幅段階に続いて、検出段階は DNA
25 検出に有効な方法であればどんな方法でもよい。例えば、アガロースゲル電気泳動などが用いられる。

目的とするDNAはテンプレートとして機能する。サンプル中のテンプレートDNAの増幅はプライマーペアを二重DNAと処理することにより行われる。この処理により各核酸配列に相補的な配列が伸長する。この伸長し生成した配列はさらにプライマーのテンプレートとして機能する。この処理プロセスは、DNAの変性、プライマーと相補的な配列とのアニーリング、DNAポリメラーゼ（例、Taq polymerase）によるプライマーの伸長からなり、目的とする配列の存在を検出するのに必要な量のDNAが生成されるまで繰り返す。PCR法による増幅条件は後述の実施例3にまとめた。

10

増幅に次いで増幅した配列をアガロースゲル電気泳動により検出する。プライマーペア〔VP1（配列番号5）、VP2（配列番号6）〕はgyrB遺伝子配列を目的部分として用いた場合285bpの配列を増幅する。

15 ATCC, JCM, CDC, NCIMBのコレクションから得たビブリオ属の37種の株について285bpのDNAの増幅を行った。これらの細菌の染色体DNAは常法（Sambrook et al., Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 1989）にしたがって調製した。

20 1 μ gの目的DNAを用い、PCR法を行った。285bpの特異的なバンドは腸炎ビブリオにのみ認められ、他の菌種ではいずれにおいても認められなかった（表1）。しかし、山本、原山（1995）らによるプライマーセット（UP-1、UP-2r）を用いたPCR増幅では1.2kbのgyrB部分を検出したので、DNA gyrase Bサブユニットの存在は確かめられた。これらの知見から本発明のプライマーは腸

25 炎ビブリオ特異的であり、この病原菌を検出するのに用いることができ

る。

- 本発明は、配列番号 1 から得られる核酸配列をもち、腸炎ビブリオに特徴的な核酸配列を増幅し得る少なくとも 1 の部位を含むことを特徴とするオリゴヌクレオチドである。本発明は、配列番号 1 から得られるが、
- 5 配列番号 3 から得られない核酸配列をもち、腸炎ビブリオに特徴的な核酸配列を増幅し得る少なくとも 1 の部位を含むことを特徴とする含むオリゴヌクレオチドである。

10

15

20

25

表1

S.no.	Microbes	Strain number	PCR results of gyrB	
			1.2-kb	285bp
1	<i>Vibrio aestuarianus</i>	ATCC35048	+	-
2	<i>Vibrio albensis</i>	ATCC14547	+	-
3	<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC17749	+	-
4	<i>Vibrio campbelli</i>	ATCC25920	+	-
5	<i>Vibrio carchariae</i>	ATCC35084	+	-
6	<i>Vibrio cholerae</i> O1	P1418	+	-
7	<i>Vibrio cholerae</i> non O1	NR	+	-
8	<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	ATCC35912	+	-
9	<i>Vibrio costicola</i>	ATCC33508	+	-
10	<i>Vibrio diazotrophicus</i>	ATCC33466	+	-
11	<i>Vibrio fischeri</i>	ATCC7744	+	-
12	<i>Vibrio fluvialis</i>	JCM3752	+	-
13	<i>Vibrio furnissii</i>	ATCC35016	+	-
14	<i>Vibrio gazogenes</i>	ATCC29988	+	-
15	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC14126	+	-
16	<i>Vibrio hollisae</i>	CDC75-80	+	-
17	<i>Vibrio logei</i>	ATCC29985	+	-
18	<i>Vibrio marinus</i>	ATCC15381	+	-
19	<i>Vibrio mediterranei</i>	ATCC43341	+	-
20	<i>Vibrio metschnikovii</i>	ATCC7708	+	-
21	<i>Vibrio mimicus</i>	CNS9582	+	-
22	<i>Vibrio mytili</i>	NCIMB13275	+	-
23	<i>Vibrio natriegens</i>	ATCC14048	+	-
24	<i>Vibrio navarrensis</i>	NCIMB13120	+	-
25	<i>Vibrio nereis</i>	ATCC25917	+	-
26	<i>Vibrio nigrapulchritudo</i>	ATCC27043	+	-
27	<i>Vibrio ordalii</i>	ATCC33509	+	-
28	<i>Vibrio orientalis</i>	ATCC33934	+	-
29	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC17802	+	+
30	<i>Vibrio proteolyticus</i>	ATCC15338	+	-
31	<i>Vibrio salmonicida</i>	ATCC43839	+	-
32	<i>Vibrio splendidus</i>	ATCC33125	+	-
33	<i>Vibrio tubiashii</i>	ATCC19109	+	-
34	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 2046	+	-
35	<i>Listonella anguillarum</i>	ATCC19264	+	-
36	<i>Listonella pelagia</i>	ATCC25916	+	-
37	<i>Photobacterium damsela</i>	ATCC33539	-	-

< Strain number >

ATCC: American Type Culture Collection

JCM: Japan Collections of Microorganisms

NCIMB: National Collections of Industrial and Marine Bacteria

CDC: Centre for Disease Control

上記以外は菌株名

同様に、Aeromonas, Alteromonas, Marinomonas, Shigella,
Shewanella, Salmonella, Escherichia属またはStaphylococcus aureus
 の標準株についても gyrB と腸炎ビブリオ特異的な 285 bp 配列の
 検出を行った。表 2 に示したようにいずれの株においても gyrB の存
 在は認められたが、腸炎ビブリオ特異的な 285 bp 配列は認められな
 かった。

表 2

10

15

20

S.no.	Microbes	Strain number	PCR results of <i>gyrB</i>	
			1.2-kb	285bp
1	<i>Alteromonas atlantica</i>	ATCC19262	+	-
2	<i>Alteromonas carrogeenovara</i>	ATCC43555	+	-
3	<i>Alteromonas citrea</i>	ATCC29719	+	-
4	<i>Alteromonas espejiana</i>	ATCC29659	+	-
5	<i>Alteromonas haloplanktis</i>	ATCC14393	+	-
6	<i>Alteromonas luteoviolaceae</i>	ATCC33492	+	-
7	<i>Alteromonas macleodii</i>	ATCC27126	+	-
8	<i>Alteromonas tetraodonis</i>	NCIMB13177	+	-
9	<i>Alteromonas undina</i>	ATCC29660	+	-
10	<i>Marinomonas communis</i>	ATCC27118	+	-
11	<i>Marinomonas vaga</i>	ATCC27119	+	-
12	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC19570	+	-
13	<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	+	-
14	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC13311	+	-
15	<i>Shewanella putrefaciens</i>	ATCC8071	+	-
16	<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC13313	+	-
17	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC29930	+	-
18	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC12600	+	-

腸炎ビブリオには種々の表現型、血清型、毒素産生型が報告されてい
 る。腸炎ビブリオによって産生される毒素の一つである熱安定なヘモリ
 ジンに特異的なプローブが報告されている (Nishibuchi et al., FEMS
 Microbiol. Lett. 55 : 251-256, 1990)。これらの毒素特異的なプローブ

は臨床的には重要であるが、すべてのタイプの腸炎ビブリオを検出することはできない。食品の腸炎ビブリオによる汚染を防ぐには、食品、あるいはその環境中のすべてのタイプの腸炎ビブリオを検出する必要がある。食品、水、土壌など種々のものから単離された腸炎ビブリオについてその表現型、血清型、毒性を調べた。これら 118 株すべての腸炎ビブリオの株についてプライマー VP1、VP2 を用いた PCR 法を行った。あきらかに 285 bp の配列が増幅された。

結果を表 3 に示す。表 3 の株は食品、土、水または糞便から分離同定した株であり、一部は岡山大学篠田先生、九州大学山本先生から譲り受けた。表 3 に示すように、同様に種々のものから単離された 20 株のビブリオ アルジノリティカスにおいては 285 bp の配列の増幅は認められなかった。

本発明は、配列番号 1 から得られる核酸配列をもち、腸炎ビブリオに特徴的な核酸配列を増幅し得る少なくとも 1 の部位を含むが、ビブリオ アルジノリティカスおよびビブリオ ハーベイに由来する核酸配列を増幅し得ないことを特徴とするオリゴヌクレオチドである。

本発明は、配列番号 1 から得られるが、配列番号 3 から得られない核酸配列をもち、腸炎ビブリオに特徴的な核酸配列を増幅し得る少なくとも 1 の部位を含むが、ビブリオ アルジノリティカスおよびビブリオ ハーベイに由来する核酸配列を増幅し得ないことを特徴とするオリゴヌクレオチドである。

表 3

S.no.	Name	Strain no.	神奈川県現象	PCR
1	<i>V. parahaemolyticus</i>	33-7	+	+
2	<i>V. parahaemolyticus</i>	33-8	+	+
3	<i>V. parahaemolyticus</i>	33-10	+	+
4	<i>V. parahaemolyticus</i>	V83	+	+
5	<i>V. parahaemolyticus</i>	WP-1(y)	+	+
6	<i>V. parahaemolyticus</i>	WP-1	+	+
7	<i>V. parahaemolyticus</i>	39-11	-	+
8	<i>V. parahaemolyticus</i>	46-11	-	+
9	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3301	-	+
10	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3314	-	+
11	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3321	-	+
12	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3326	-	+
13	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3331	-	+
14	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3343	-	+
15	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3345	-	+
16	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3346	-	+
17	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3354	-	+
18	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3360	-	+
19	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3627	-	+
20	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3629	-	+
21	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3633	-	+
22	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3634	-	+
23	<i>V. parahaemolyticus</i>	BB22	-	+
24	<i>V. parahaemolyticus</i>	ML34	-	+
25	<i>V. parahaemolyticus</i>	ML159	-	+
26	<i>V. parahaemolyticus</i>	ML1017	-	+
27	<i>V. parahaemolyticus</i>	MY67-6	-	+
28	<i>V. parahaemolyticus</i>	MY73-2	-	+
29	<i>V. parahaemolyticus</i>	OK80-480	-	+
30	<i>V. parahaemolyticus</i>	OKA80-214	-	+
31	<i>V. parahaemolyticus</i>	OKA80-232	-	+
32	<i>V. parahaemolyticus</i>	S53	-	+
33	<i>V. parahaemolyticus</i>	RIMD2210521	-	+
34	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR1-01	-	+
35	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR3-02	-	+
36	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR4-01	-	+
37	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR4-02	-	+
38	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR6-01	-	+
39	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR6-02	-	+
40	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR7-01	-	+
41	<i>V. parahaemolyticus</i>	KB1-01	-	+
42	<i>V. parahaemolyticus</i>	KB1-03	-	+

PCR法を用いたアッセイ系の評価を行うために、腸炎ビブリオATCC 17802株のゲノムDNAの希釈液を調製し、PCR増幅のテンプレートとして用いた。1 ngのゲノムDNAしか含有しない希釈液からもプライマーVP1、VP2を用いた増幅により検出できた。感度を5 ngレベルからpgレベルにあげるために、電気泳動したDNAをサザンブロットにかけた。腸炎ビブリオATCC 17802株の培養細胞の希釈液で上記プライマーによる増幅を行ったところ、およそ1 cfu/reaction tubeの検出限界であった。このようにPCR法による検出限界は1 cfu/10 μ lまたは10³ cfu/mlであった。プレーティング、選択的寒天培地による検出は1生存細胞を検出する感度を持つが労力と時間を必要とする。

PCR法によるアッセイ系は従来の検出法に比べ、細菌の検出法に必須の速度、感度、特異性のバランスにおいて優れており、有用である。

発明を実施するための最良の形態

本発明を実施例によって説明する。実施例は実施の1態様であり、本発明を限定するものではない。

20

実施例1

従来法による食品中の腸炎ビブリオの単離

25 gの食品サンプルにアルカリペプトン水〔日水製薬（株）製〕を加え腸炎ビブリオATCC 17802株を接種し、37℃で18時間培養した。1白金耳量の培養液をTCBS寒天培地に画線接種し、37℃25 で24時間培養した。すべての緑色コロニーをさらにT₁N₁寒天培地

(Bacto tryptone 1%, NaCl 1%, 寒天1.5%含有蒸留水)
上で単離した。よく単離されたコロニーを生化学的試験にかけた。以下の性質を示す菌株を典型的な腸炎ビブリオと同定した。オキシダーゼ、
リシンデカルボキシラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、セラチナー
5 ーゼ、リバーゼ、キチナーゼ陽性；インドール産生；食塩濃度0.5～
8%、42℃で生育する；O/129（150 μg）に対する感受性有
り；グルコース、マンニトール、マンノースから酸を生成；アルギニン
デヒドロゲナーゼ、アルギナーゼ陰性；食塩濃度0%では生育しない；
蔗糖、乳糖、サリシンから酸を生成しない。

10

実施例2

染色体DNAの単離

腸炎ビブリオの株をTSB培地（栄研製）中で37℃、約24時間振
とう培養した。細胞は遠心分離（トミー精工製）して（15,000 r
15 p m, 15分間、4℃）採取し、10 mlの滅菌TE緩衝液（10 mM
T r i s、1 mM E D T A、p H 8.0）に懸濁させた。細胞をリゾ
チーム（最終濃度1 mg/ml；和光製）により溶解し、静かに振とう
しながら、37℃に20分間保持した。この溶解した細胞にSDS（最
終濃度0.5%）を加え、65℃でインキュベートした。蛋白とRNA
20 を分解させるために、それぞれプロテイナーゼK（最終濃度500 μg
/ml）とRNase（最終濃度5 μg/ml）を加え、37℃でそれ
ぞれ30分間、60分間インキュベートした。サンプルは緩衝フェノー
ル（G I B C O / B R L）で3回、フェノール：クロロホルム（1：1）
で1回、クロロホルム：イソアミルアルコール（24：1）で1回抽出
25 した。清澄な上清を得るために遠心分離を行い、DNAは2倍量の氷冷
エタノール：3 M酢酸ナトリウム（10：1）で沈殿させた。この反応

液を -20°C で一晩保存した。沈殿したDNAは遠心分離で濃縮し、エタノールを減圧留去した。この乾燥DNAをTE緩衝液に溶解し、DNAテンプレートとして用いた。DNAの純度はアガロースゲル電気泳動により調べ、DNA濃度は分光光度計によって測定した。

5

実施例3

PCR法によるアッセイ

サンプル調製

10 DNAを抽出しない菌の全細胞もテンプレートとして用いた。この場合、寒天培地で生育した新鮮な菌細胞を用いた。液体培地で生育した細胞を用いる場合には遠心分離により菌細胞を分離し、PBS緩衝液(pH 7.5)で1度洗浄し、適当な数の菌細胞を用いた。場合によってはフェノール・クロロホルムによりDNAを抽出し、PCR増幅のテンプレートとして用いた。

15

PCR増幅条件

PCRアッセイはDNA Thermal Cycler (Perkin Elmer)で行った。反応液 $100\mu\text{l}$ (Tris-HCl 100mM , MgCl_2 15mM , KCl 500mM , pH 8.3)は、ゲノムDNA 100ng 、 $200\mu\text{M}$ のdNTPs、 $1\mu\text{M}$ のプライマーを含有する。DNA変性は 94°C 、60秒間、アニーリングは 60°C 、60秒間、DNA伸長は 72°C 、120秒間で、30サイクル行った。増幅に次いで、検出はゲル電気泳動によって行った。サンプル $20\mu\text{l}$ はアガロースゲル電気泳動(1%アガロース、SeaKem ME, FMC Bioproducts, Rockland, Maine)にかけた。DNAバンドはエチジウム

20

25

プロマイド溶液で10分間染色後、紫外線照射して観察した。

産業上の利用可能性

- 5 腸炎ビブリオの g y r B 遺伝子に特異的に反応して、他のビブリオ種及びビブリオ属以外の菌株から区別、同定できるようなプライマーを提供することができた。

腸炎ビブリオ特異的プライマーにより、DNAの抽出等の操作なしで、
菌細胞からの腸炎ビブリオ特異的な285bpの g y r B 遺伝子断片を
10 PCR法により検出できる。

15

20

25

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 1 2 5 8

5 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : ゲノミック DNA

10 配列

GAAGTCATCA TGACCGTTCT GCATGCCGGT GGTAATTCG ATGATAACTC GTACAAAGTA 60

TCAGGCGGTC TTCACGGCGT GGGTGTTCG GTAGTAAACG CACTGTCAGA AAAAGTGGTA 120

CTAACCATCC ATCGTGGCGG TCATATCCAC ACGCAAACCTT ACCGTCATGG TGAGCCTGAA 180

ACGCCTCTAG CGGTTGTGGG TGATGCGGAT AAAACTGGTA CACAAATTCG TTTCTGGCCA 240

15 AGTGCAGAAA CTTTCTCTAA CACTGAATTC CATTACGACA TCCTAGCAA ACGTCTGCGT 300

GAGCTATCGT TCTTGAATC AGGCGTTTCT ATCAAGCTTA TTGATGAGCG CGAAGCGGAC 360

AAGCAAGATC ACTTCATGTA TGAAGGTGGT ATTCAAGCGT TCGTTCAGCA CTTAAACACC 420

AACAAAACAC CAATCATCGA GAAAATCTTC CACTTCGACT TAGAACGTGA AGACGGCATT 480

TCGGTAGAAG TGGCAATGCA GTGGAACGAT GGTTCCTCAAG AGAACATCTT CTGTTTCACC 540

20 AACACATTC CACAGCGCGA TGGTGGTACT CACCTTGCTG GTTTCCTGTC GGCAATAACA 600

CGTACGCTAA ACAGCTTTAT GGATAAAGAA GGCTTCTCGA AGAAAGCGAA AACGGCAACG 660

TCAGGCGACG ATGCGCGTGA AGGTTTGACT GCCGTTGTTT CAGTAAAAGT GCCTGATCCA 720

AAATTCTCGA GCCAAACAAA AGACAAACTG GTTCTTCTG AAGTGAAATC AGCGGTTGAA 780

TCGGCGATGG GTGAGAAGCT ATCTGAGTTC TTGGTCGAAA ACCCAAGTGA AGCGAAAATG 840

25 GTTGTTTCGA AAATCATCGA TGCAGCACGT GCACGTGAAG CCGCACGTAA AGCGCGTGAA 900

ATGACTCGTC GTAAAGGCGC GCTAGACCTA GCAGGCCTAC CAGGCAAACCT TGCAGACTGT 960

CAGGAAAAAG ATCCGGCACT CTCTGAACTA TACATTGTGG AGGGTGACTC TGCGGGTGGT 1020
TCAGCTAAGC AGGGTCGTAA TCGTAAGAAT CAGGCAATCC TACCACTGAA AGGTAAGATC 1080
CTGAACGTAG AAAAAGCACG TTTCGACAAG ATGTTGTCTT CGCAAGAAGT TGCAACGCTT 1140
ATTACAGCAC TTGGCTGTGG TATCGGTCGT GACGAGCACA ACCCGGACAA ACTGCGTTAC 1200
5 CACAACATCA TCATCATGAC CGACGCAGAC GTAGAGGCTC GCACATCCGT ACCCTGCT 1258

配列番号 : 2

配列の長さ : 4 1 9

10 配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直線状

配列の種類 :

配列

15 EVIMTVLHAG GKFDNSYKV SGGLHGVGS VVNALSEKVV LTIHRGGHIH TQTYRHGEPE 60
TPLAVVGAD KTGTQIRFWP SAETFSNTEF HYDILAKRLR ELSFLNSGVS IKLIDEREAD 120
KQDHFMYEGG IQAFVQHLNT NKTPIIEKIF HFDLEREDGI SVEVAMQWND GFQENIFCFT 180
NNIPQRDGGT HLAGFRAAIT RTLNSFMDKE GFSKKAKTAT SGDDAREGLT AVVSVKVPDP 240
KFSSQTKDKL VSSEVKSAVE SAMGEKLSEF LVENPSEAKM VCSKIIDAAR AREAARKARE 300
20 MTRRKALDL AGLPGKLADC QEKDPALSEL YIVEGDSAGG SAKQGRNRKN QAILPLKGKI 360
LNVEKARFDK MLSSQEVATL ITALGCGIGR DEHNPDKLRY HNIIIMTDAD VEARTSVPC 419

配列番号 : 3

25 配列の長さ : 1 2 5 8

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：ゲノミックDNA

5 配列

GAAGTCATCA TGACCGTTCT GCATGCAGGT GGTAAATTCG ACGATAACAC AAACAAATTA 60
TCGGGTGGTC TCCACGGGGT ACGTGTCTCA GTAATAAACG CACTATCAGA GAAAGTTGAG 120
CTAACGATTC ATCGTGGTGG CCATATCCAT ACGCAAACCT ACCGCCATGG TGAGCCTGCA 180
ACGCCACTAG CCGTTGTGGG TGATACGGAT AAAACCGGTA CACAAATTCG TTTCTGGCCA 240
10 AGTGCCGAGA CGTTCTCTAA CACTGAGTTC CACTATGACA TTCTGGCGAA ACGCCTGCGT 300
GAACTGTCAT TCCTGAACTC TGGTGTGTCG ATCAAATTGG TTGATGAACG TGAAGCGGAC 360
AAACATGATC ACTTCATGTA TGAAGGTGGT ATTCAAGCGT TCGTTGATCA CCTAAACACC 420
AACAAAACGC CAATCATCGA GAGGGTCTTC CACTTTAACT CTGAGCGTGA AGACGGCATT 480
TCAGTTGAAG TGGCGATGCA ATGGAACGAT GGTTCCTCAAG AGAACATCTT CTGCTTTACC 540
15 AACATATCC CACAGCGTGA TGGTGGTACT CACCTTGCTG GTTTCCTGTC TGCCTAACA 600
CGTACATTGA ACAGCTTTAT GGATAAAGAA GGTTCCTCGA AGAAAGCGAA AACAGCGACT 660
TCAGGCGACG ATGCGCGTGA AGGTCTAACT GCGGTTGTTT CCGTGAAAGT GCCTGATCCT 720
AAGTTCTCAA GCCAAACAAA AGACAAACTG GTTCTTCTG AAGTGAAATC AGCTGTTGAG 780
TCTGCAATGG GTGAAAAACT GTCTGAGTTC TTGATTGAGA ACCCGACAGA AGCGAAGATG 840
20 GTTTGTTCGA AAATCATCAA TGCAGCACGT GCATCTGAAG CAGCGCCTAA AGCTCGTGAA 900
ATGACGCGCC GTAAAGGTGC ACTAGACCTA GCAGGCCTTC CAGGTAAAGT TGCAGACTGT 960
CAGGAAAAAG ATCCGGCACT CTTTGAACTA TACATAGTGG AGGGTGAATC GGCAGGCGGT 1020
TCCGCAAAAC AAGGCCGTAA CCGTAAGAAC CAAGCGATCA CACCGCTAAA AGGTAAGATT 1080
CTTAACGTAG AAAAAGCACG TTTCGACAAG ATGCTATCTT CTCTAGAAGT AGTAACACTG 1140
25 ATCACCGCAT TAGGTTGTGG TATCGGTCGT GACGAGGACA ACCCGGACAA GCCTCGGGAC 1200
CACAACATAA TCATCATGAC CGACGCAGAC GTAGAGGCTC GCACATCCGT ACCCTGCT 1258

2 1

配列番号 : 4

配列の長さ : 4 1 9

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直線状

5 配列の種類 :

配列

EVIMTVLHAG GKFDNTNKL SGGLHGVRS VINALSEKVE LTIHRGGHIH TQTYRHGEPA 60
TPLAVVGDTD KTGTQIRFWP SAETFSNTEF HYDILAKRLR ELSFLNSGVS IKLVDEREAD 120
10 KHDHFMYEGG IQAFVDHLNT NKTPIIERVF HFNSEREDGI SVEVAMQWND GFQENIFCFT 180
NNIPQRDGGT HLAGFRAALT RTLNSFMDKE GFSKKAKTAT SGDDAREGLT AVSVKVPDP 240
KFSSQTKDKL VSSEVKSAVE SAMGEKLSEF LIENPTEAKM VCSKIINAAR ASEAAPKARE 300
MTRRKALDL AGLPGKYADC QEKDPALFEL YIVEGESAGG SAKQGRNRKN QAITPLKGKI 360
LNVEKARFDK MLSSLEVVTI ITALGCGIGR DEDNPDKPRD HNIIIMTDAD VEARTSVPC 419

15

配列番号 : 5

配列の長さ : 2 1

配列の型 : 核酸

20 鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : ゲノミック DNA

配列

25 C G G C G T G G G T G T T T C G G T A G T

配列番号 : 6

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

5 トポロジー : 直線状

配列の種類 : ゲノミック DNA

配列

TCC GCT TCG CGC TCA TCA ATA

10

15

20

25

請 求 の 範 囲

1. 配列番号1から得られる核酸配列をもち、腸炎ビブリオに特徴的な核酸配列を増幅し得る少なくともひとつの部位を含むことを特徴とする
5 オリゴヌクレオチド。
2. 配列番号3から得られない核酸配列である請求項1のオリゴヌクレオチド。
3. ビブリオ アルジノリティカスおよびビブリオ ハーベイに由来する核酸配列を増幅し得ない請求項1または2のオリゴヌクレオチド。
- 10 4. 配列番号5または配列番号6で示される請求項1、2または3のオリゴヌクレオチド。
5. 請求項1ないし4のいずれかのオリゴヌクレオチドを2種類組み合わせたプライマーセットを用いて、検体中のDNAジャイレースサブユニットB遺伝子配列を標的とし、当該標的核酸配列を選択的に増幅させ、
15 検体中に腸炎ビブリオに特異的なgyrBユニットが存在するか否かを決定することで腸炎ビブリオの検出を行う方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl ⁶ C12N15/11, C12Q1/68, C12Q1/04, C07H21/04 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl ⁶ C12N15/11, C12Q1/68, C12Q1/04, C07H21/04 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, BIOSYS, MEDLINE, GENETYX		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 7-213299, A (Marine Biotechnology Institute Co., Ltd.), August 15, 1995 (15. 08. 95) (Family: none)	1 - 5
Y	Applied and Environmental Microbiology, Vol. 61(3) (1995) S. Yamamoto et al. "PCR Amplification and Direct Sequencing of gyrB Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of Pseudomonas putida Strains" p. 1104-1109	1 - 5
Y	JP, 4-262799, A (Toyobo Co., Ltd.), September 18, 1992 (18. 09. 92) (Family: none)	1 - 5
Y	JP, 7-114719, B (Shimadzu Corp.), December 13, 1995 (13. 12. 95) (Family: none)	1 - 5
Y	JP, 5-123197, A (Shimadzu Corp.), May 21, 1993 (21. 05. 93) (Family: none)	1 - 5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search May 26, 1997 (26. 05. 97)		Date of mailing of the international search report June 3, 1997 (03. 06. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00991

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Microbial Pathogenesis, Vol. 18 (1995) J. Okuda et al. "Distribution of the cytolethal distending toxin A gene(cdtA) among species of Shigella and Vibrio, and cloning and sequencing of the cdt gene from Shigella dysenteriae" p. 167-172	1 - 5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
IntCl ⁶ C12N15/11, C12Q1/68, C12Q1/04, C07H21/04		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
IntCl ⁶ C12N15/11, C12Q1/68, C12Q1/04, C07H21/04		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, BIOSYS, MEDLINE, GENETYX		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 7-213299, A (株式会社海洋バイオテクノロジー研究所) 15. 8月. 1995 (15. 08. 95) (ファミリーなし)	1-5
Y	Applied and Environmental Microbiology, Vol. 61[3] (1995) S. Yamamoto <i>et al.</i> [PCR Amplification and Direct Sequencing of <i>gyrB</i> Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of <i>Pseudomonas putida</i> Strains] p. 1104-1109	1-5
Y	J P, 4-262799, A (東洋紡績株式会社) 18. 9月. 1992 (18. 09. 92) (ファミリーなし)	1-5
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 26. 05. 97		国際調査報告の発送日 03. 06. 97
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 藤田 節 4 B 9453 電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 7-114719, B (株式会社島津製作所) 13. 12月. 1995 (13. 12. 95) (ファミリーなし)	1-5
Y	J P, 5-123197, A (株式会社島津製作所) 21. 5月. 1993 (21. 05. 93) (ファミリーなし)	1-5
Y	Microbial Pathogenesis, Vol. 18 (1995) J. Okuda <i>et al.</i> [Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (<i>cdtA</i>) among species of <i>Shigella</i> and <i>Vibrio</i> , and cloning and sequencing of the <i>cdt</i> gene from <i>Shigella dysenteriae</i>] p. 167-172	1-5